

4-(2-FORMYLAMINOVINYL)PHENOL, ITS SALT AND ITS PREPARATION

Publication number: JP59175891 (A)

Publication date: 1984-10-04

Inventor(s): UMEHARA KAZUYOSHI; YOSHIDA KEIZOU; KOUSAKA MASANOBU; IMANAKA HIROSHI *

Applicant(s): FUJISAWA PHARMACEUTICAL CO *

Classification:

- international: A61K31/135; A61K31/165; A61P7/02; C07C231/00; C07C233/18; C07C67/00; C12P7/24; A61K31/135; A61K31/165; A61P7/00; C07C231/00; C07C233/00; C07C67/00; C12P7/24; (IPC1-7): A61K31/135; C07C103/38; C12P7/24

- European:

Application number: JP19830053250 19830328

Priority number(s): JP19830053250 19830328

Abstract of JP 59175891 (A)

NEW MATERIAL: 4-(2-Formylaminovinyl)phenol or a salt with it and an organic or inorganic base.
EXAMPLE: 4-(2-Formylaminovinyl)phenol. USE: Useful as an inhibitor of blood platelet aggregation.
PREPARATION: A fungus such as *Aspergillus fumigatus* Fresenius No.5239 (FERM- P 6993) belonging to the genus *Aspergillus*, capable of producing 4-(2-formylaminovinyl)phenol at about 25-30 deg.C for about 50-100hr, and 4-(2-formylaminovinyl)phenol or its salt is collected from its culture solution.

.....
Data supplied from the *espacenet* database — Worldwide

③ 日本国特許庁 (JP)

④ 特許出願公開

⑤ 公開特許公報 (A)

昭59—175891

⑥ Int. Cl. ³	識別記号	庁内整理番号	⑦ 公開 昭和59年(1984)10月4日
C 12 P 7/24		6760—4B	
A 61 K 31/135	ACB	7330—4C	発明の数 3
C 07 C 103/38		7375—4H	審査請求 未請求
//(C 12 P 7/24			
C 12 R 1/68)			(全 5 頁)

⑧ 4—(2—ホルミルアミノビニル)フェノール、その塩およびそれらの製造法

⑨ 発明者 向阪正信

堺市赤坂台5—26—8

⑩ 発明者 今中宏

大阪府三島郡島本町桜井4—19—25

⑪ 特 願 昭58—53250

⑫ 出 願 昭58(1983)3月28日

⑬ 発明者 梅原万義

芦屋市朝日ヶ丘町10—35—613

⑭ 出 願 人 藤沢薬品工業株式会社

大阪市東区道修町4丁目3番地

⑮ 発明者 吉田啓造

吹田市山田4—41—3—509

⑯ 代理人 弁理士 青木高

明 細 書

1. 発明の名称

4—(2—ホルミルアミノビニル)フェノール、

その塩およびそれらの製造法

2. 特許請求の範囲

(1) 4—(2—ホルミルアミノビニル)フェノールまたはその塩。

(2) アスベルギルス属に属する4—(2—ホルミルアミノビニル)フェノールを生産する菌を培養し、得られる培養物から4—(2—ホルミルアミノビニル)フェノールまたはその塩を分離、採取することを特徴とする4—(2—ホルミルアミノビニル)フェノールまたはその塩の製造法。

(3) 4—(2—ホルミルアミノビニル)フェノールまたはその塩を有効成分とする血小板凝集阻害剤。

3. 発明の詳細な説明

この発明は新規な4—(2—ホルミルアミノビ

ニル)フェノールまたはその塩に関する。さらに詳細には、この発明は血小板凝集阻害作用を有する4—(2—ホルミルアミノビニル)フェノールまたはその塩、それらの製造法およびそれらを有効成分とする血小板凝集阻害剤に関する。

4—(2—ホルミルアミノビニル)フェノールの塩類としては4—(2—ホルミルアミノビニル)フェノールと有機塩基または無機塩基との塩(例えば、ナトリウム塩、カリウム塩、アンモニウム塩、トリエチルアミン塩、エタノールアミン塩など)が挙げられる。

この発明の発明者は土壌から新しく分離したアスベルギルス属に属する菌が新規な4—(2—ホルミルアミノビニル)フェノールを生産することを見出し、その化学構造を解明しこの発明を完成した。

(1) 4—(2—ホルミルアミノビニル)フェノールの製造法

4—(2—ホルミルアミノビニル)フェノールは例えばアスベルギルス・フリガトスのようなア

スペルギルス属に属する4-(2-ホルミルアミノビニル)フェノールを生産する菌を常法に従って培養することによって製造することができる。

この発明で使用する4-(2-ホルミルアミノビニル)フェノールを生産する菌のうち、この発明の発明者が静岡県富士市で採集した土壌から新しく分離した菌株(株5239と番号を付す)は次に示す菌学的性質を有している。

①各種培地における生育状態

① ツアベック寒天培地

ツアベック寒天培地上では速く広がる(25℃、10日の培養で直径7.5cmであった)。蒸菌糸層は平皿で比較的薄く(0.9~1.4mm)白色である。集落表面は羊毛状であり、最初は白色で分生子の形成につれて緑味を帯びる。分生子頭、分生子の形成は良好である。集落表面は黄味を帯びた白色である。

② 麦芽抽出寒天培地

麦芽抽出寒天培地上での生育はツアベック寒天培地上よりも速い(直径6cm)。蒸菌糸層

は薄く(0.2~0.5mm)平皿で集落表面はフェルト状から羊毛状であり、暗緑色である。中心より1~2cm離れた部分は気生菌糸が発達し環状の白い帯となる。分生子頭、分生子の形成は非常に良好である。集落表面は白色から薄い緑色である。

③ MY25寒天培地

MY25寒天培地上では速く広がり(直径7.5cm)、フェルト状ないしは粉状であり、暗緑色である。分生子頭、分生子の形成は非常に良好である。集落表面は薄い黄色または黄味白であり、薄い緑色の環状紋をあらわす。37℃における生育は25℃よりも速く、平皿に広がる。分生子頭、分生子の形成は著しく良く、集落表面は暗緑色で、フェルト状であり網状または粉状である。集落表面は薄い黄色または薄い緑々色である。45℃での生育は非常に抑制的である。白色で中央が盛り上がりしわを生ずる。

④ 形 態

分生子頭は密な円筒状であり、時として疎な円

- 3 -

筒状または棍棒状になる。長さは110~200(~260)μで、直径は20~60μであり、緑色から暗緑色である。

分生子柄は長さ170~610μであり、直径は基部で2~2.5μであり、頂の付近で7~10μであり、滑面であり、淡緑色である。上部1/2または2/3からトロンをもちアフラ

イドを直接形成するフィアライドは、長さ4~7μ、幅2~2.5μであり、淡緑色である。

分生子は球形から亜球形であり直径2~3μであり粉面で淡緑色である。

集落は暗緑色である。

⑤ 生理的性質

生育温度範囲

10~45℃(最適生育温度:34~41℃)

生育pH範囲

pH2.5~10(最適pH:pH6)

以上の結果を、ケー・ビー・レイパーおよびグイ・アイ・ツェナル共著「ザ・フーニス・アスペルギルス(1965年発行)(E. B. Raper and

D. I. Fennell: The Genus *Aspergillus* (1945)」の記載と併せて総合的に判断して、株5239菌をアスペルギルス・フミガタス・フレセニウス(*Aspergillus fumigatus* Presenius)と同定した。

このアスペルギルス・フミガタス・フレセニウス株5239は工業技術院微生物工業技術研究所に受託番号I研菌第6993号として寄託されている(寄託日:昭和58年5月12日)。

この発明で使用するアスペルギルス属に属する4-(2-ホルミルアミノビニル)フェノール生産菌、例えばアスペルギルス・フミガタス・フレセニウス株5239菌は、例えば天敵、紫外線などの照射処理、例えばナイトロジェン・マスタード、アゼラシ、亜硝酸、2-アミノグリシン、N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン(NTG)などの変異誘起剤による処理、フラーゲ接触、形質転換、形質導入、接合などの通常用いられる変異誘起処理方法によって4-(2-ホルミルアミノビニル)フェノールの生産能を高める

- 4 -

とができる。

4-(2-ホルミルアミノビニル)フェノールの生産はアソベルグス菌に属する4-(2-ホルミルアミノビニル)フェノール生産菌を培地に培養することによって行われる。培養方法は原則的には一般微生物の培養方法に準ずるが、通常は液体培地による深部培養法が有利である。培養に用いられる培地としては、合成培地、半合成培地あるいは天然培地が用いられ、培地組成としては、たとえばグルコース、シュクロース、グリセリン、デキストリン、澱粉などが炭素源として用いられ、また硝酸キヌ、ペプトン、カゼイン加水分解物、グルテンミール、コーンミール、結実粕、ビーナツミール、コーンステアグリカー、酵母酵母、硫酸アンモニウム、硝酸アンモニウム、尿素などの有機または無機の窒素源が用いられる。また炭酸カルシウムなどの金属の炭酸塩、硝酸2水素カリウム、硝酸水素2カリウムなどの金属の硝酸塩、塩化マグネシウムなどの金属の塩化物が適宜、添加される。培養中発酵の著しいときには、

- 7 -

任意の順序に組み合わせ、また反覆して broth から有効物質の分離、採取、精製を行なう。

(2) 4-(2-ホルミルアミノビニル)フェノールの理化学的性質

次に後記実施例1で得られた4-(2-ホルミルアミノビニル)フェノールの理化学的性質を示すと次の通りである。

①結晶の色と形状：無色の針状結晶 ($C_9H_9NO_2 \cdot 1/8 H_2O$)

② 酸碱性、酸性、中性の区別：酸性物質

③融点：142~145℃(エタノールから結晶化)

④分子量：163(マスペクトルによる)

⑤元素分析：

計算値 ($C_9H_9NO_2$ として)

C 64.24, H 5.56, N 8.58(%)

実験値

C 65.27, H 5.42, N 8.58(%)

⑥紫外線吸収スペクトル：

$\lambda_{max}^{メタノール}$: 277nm (=15600)

高級アルコール類、植物油、シリコン化合物などの消泡剤を添加するとよい。またこれらの消泡剤のうち、植物油は炭素源として使用してもよい。培養温度は25~30℃前後が適当であり、培養容量の増大に従って高気相培養を行なうと好結果が得られることが多い。本培養の培養時間は50~100時間ぐらいが適当であり、培地の濃厚化に従って培養時間をさらに延長してもよい。

以上述べた培養条件は使用生産菌株の特性に応じてそれぞれ最適な条件を選択して適用される。

このようにして培養物中に蓄積された化合物は主に培養液中に含有しているもので、遠心分離またはろ過により固体を除去した後、溶液から一般微生物質の製造に用いられる手段によって分離、採取、精製される。すなわち、減圧濃縮、凍結乾燥、溶媒抽出、液性交換、例えば陰イオン交換樹脂、陽イオン交換樹脂、非イオン性吸着樹脂などの樹脂による処理、例えば活性炭、けい酸、シリカゲル、セルロース、アルミナなどの吸着剤による処理、結晶化、再結晶などの手段を単独、あるいは

- 8 -

⑦赤外線吸収スペクトル：

ν_{max}^{KBr} : 3300, 3200, 2920, 2860, 1670, 1650, 1607, 1585, 1510, 1490, 1460, 1410, 1380, 1330, 1312, 1280, 1270(肩), 1255, 1210, 1175, 1105, 1040, 1020, 940, 855, 840, 825, 810, 765, 755, 700(肩), 665 cm^{-1}

⑧ 1H 核磁気共鳴スペクトル：

δ (ppm) (DMSO- d_6): 5.60 (1H, d, $J=10Hz$), 6.55~6.8 (1H, m), 6.78 (2H, d, $J=8Hz$), 7.22 (2H, d, $J=9Hz$), 8.13 (1H, s), 9.46 (1H, s) (D_2O で消失), 9.77 (1H, broad, $J=10Hz$ (D_2O で消失))

⑨溶媒に対する溶解性：

易溶：メタノール、エタノール、アセトン

難溶：酢酸メチル、クロロホルム、水

不溶：ヘキサン

⑩呈色反応：

塩化第2鉄反応：陽性

以上の理化学的性質および別途研究の結果から

アスペルギルス・フミガタス・フレセニウス菌
5239株が生産するこの発明に関わる物質が4
-(2-ホルミルアミノビニル)フェノールであ
ることが判明した。

(3) 4-(2-ホルミルアミノビニル)フェノ
ールの生物学的性質

次に4-(2-ホルミルアミノビニル)フェノ
ールの生物学的性質を示す上次の通りある。

① 試験管内血小板凝集阻止反応方法：

うさぎ(日本白色在来種)の耳動脈、または
頸動脈から、あらかじめ血液量の10%相当量
の3.8%クエン酸ナトリウムを入れて牽出した
試験管に採血する。この血液を1300rpm
10分(10℃)で遠心分離し、上層を約5ミ
リでポリエチレン製ピペットでとり、(血
小板含有血漿(以下PRPと記す)とする。
血小板凝集反応は次の様に進行する。既知D
RP(40万細胞/mm³)0.33mlおよび4-
(2-ホルミルアミノビニル)フェノール液
0.02mlを混合し、これに下記の凝集誘発剤0.05

- 11 -

② マウスのアラキドン酸血漿に対する効果方法：

アラキドン酸(シグマ社製)を5%エタノール
中に5mg/mlの濃度になるように0.2%炭酸ナ
トリウム溶液で調整する。種々の濃度の生理食塩水
に溶解した4-(2-ホルミルアミノビニル)フ
ェノールをマウスの腹腔内に投与し、50分後
にアラキドン酸溶液の0.2mlをマウス尾静脈より
静注する。2時間後のマウス生存率をもって効果
を判定する。

結果：

4-(2-ホルミルアミノ ビニル)フェノールの投与 量 (mg/kg)	2時間後の生存率 (%)
50	80
10	40
生理食塩水	10

1群10匹

③ 急性毒性：

マウス(♂)

LD₅₀:400mg/kg (静脈注射)

- 13 -

mlを加し、発光度の変化をSEISSCOデモア
ルシンプルーフダグロメータ(DP-247S)
(温度57℃、攪拌1000rpm)で測定する。
凝集誘発剤は次のようにして調整する。

a) アラキドン酸(シグマ社製)

500mg/mlになるように生理食塩水で
希釈して使用する。

b) コラーゲン(牛のアキレス腱由来)(東京
化成製)：

生理食塩水10mlにコラーゲン200mgを
加え冷却しながら超音波処理(5A、8分)
し、大きなかたまりをアサントし上清を使用
する。使用にあたって、適当な濃度に生理食
塩水で希釈する。

結果：

血小板凝集誘発剤	4-(2-ホルミルアミノ ビニル)フェノールが 血小板凝集を50%阻止 する濃度(IC ₅₀)(μl/ml)
アラキドン酸	1.25
コラーゲン	5

- 12 -

次にこの発明を実施例により説明する。

実施例1

澱粉1%, グルテンミール1%, 乾燥酵母0.5
%, コーンステープリカー0.5%, アデカノール
(商標：旭電化株式会社製)0.05%の組成の培
地を500ml容コルベン5本にそれぞれ100ml
ずつ分注し、滅菌をして120℃で20分間滅菌
した。各培地にアスペルギルス・フミガタス・フ
レセニウス菌5239株の斜面培養物1白金芽ず
つを接種し、30℃で3日間培養した。別に、澱
粉3%, グルテンミール0.5%, 乾燥酵母0.5%
ビエナツミール0.5%, 炭酸ナトリウム0.06
%, アデカノール0.1%の組成の培地200mlを
300ml容ジャーファーマンダーに注入し、120
℃で20分間滅菌した後、上記培養物の全量を接
種し、30℃で3日間培養した。

培養終了後、培養物にけい酸土450gを添加
し、混合した。得られた溶液を水酸化ナトリウム
にてpH7.0に修正し、吸着樹脂RP-20(商
標：三菱化成工業株式会社製)を3gを充てんし

- 14 -

たカラムに吸着させ、9.8の水で洗った後、ノドノール2.8で活性物質を溶出した。溶出液を減圧濃縮し、濃縮液を9.8.4.1に修正した後、酢酸エチル1.8で2回抽出した。抽出液を濃縮し油状物質を得た。これを2.0.0.8のシリカゲルを充てんしたカラムクロマトグラフィーに付した。活性区分を酢酸エチルで溶出した。このカラム操作をもう一度繰り返すと、活性フラクションから4-(2-ホルミルアミノビニル)フェノールが結晶として、6.0g得られた。なお、精製工程における活性の測定は、血小板凝集阻害作用をもって測定した。

出願人 藤沢薬品工業株式会社

代理人 弁護士 青木 高

